Lane Medical Library

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
(Vorstand: Professor Dr. Broemser).

Über die Hemmung der Milchsäurebildung im Muskel durch Sauerstoff.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eugen Maximilian Diem
aus München.

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
in München.

Meiner geliebten Mutter in

immerwährender Dankbarkeit!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153302_0075

Über die Hemmung der Milchsäurebildung im Muskel durch Sauerstoff.

Es ist schon seit langer Zeit bekannt, daß das Glykogen des Muskels bei Abwesenheit von Sauerstoff in Milchsäure aufgespalten wird (1). Dieser Vorgang heißt Glykolyse. Warburg fand 1926, daß die Gegenwart von Sauerstoff die Glykolyse sehr stark hemmt und bezeichnete diesen Vorgang als „Pasteur'sche Reaktion". Meyerhof, der die Pasteur'sche Reaktion am Muskel anstellte, konnte die Neubildung von Glykogen aus Milchsäure nachweisen, die sich nur bei Anwesenheit von Sauerstoff und unter sehr gesteigerter Muskelatmung vollzieht (Resynthese Meyerhof's). Er stellte fest, daß der größte Teil der glykolytisch entstandenen Milchsäure ($^4/_5$) im oxydativen Abschnitt des Muskelstoffwechsels in Form einer gekoppelten Reaktion wieder zu Glykogen aufgebaut wird, während der Rest ($^1/_5$) weiter zu Kohlensäure und Wasser verbrennt (Meyerhof'scher Quotient) (2). 1931 bewiesen Hahn, Belmonte und Niemer — entgegen der Ansicht Meyerhof's — daß diese Resynthese von Glykogen aus Milchsäure an die erhaltene Struktur des intakten Muskels wahrscheinlich an die Struktur der Muskelfibrillen, geknüpft ist (3). Wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, genügt einmaliges Querzerschneiden des Muskels, um die Bildung von Kohlehydraten in laktathaltiger Ringerlösung auf ein Drittel des Wertes im intakten Muskel herabzusetzen.

Versuche mit isotonischer Lösung. (mg Kohlehydrat.)

Nr.	Unzerschnitten			Querzerschnitten		
	Ohne Laktat	Mit Laktat	Kohlehydratvermehrung m. Laktat	Ohne Laktat	Mit Laktat	Kohlehydratvermehrung m. Laktat
1.	14,9	17,4	2,5	13,3	13,2	—0,1
2.	15,1	17,9	2,8	12,7	12,6	—0,1
3.	10,2	12,7	2,5	11,7	13,0	1,3
4.	10,6	14,2	3,6	11,1	12,8	1,7
5.	15,6	17,2	1,6	11,3	11,3	0,0
6.	11,1	12,0	0,9	9,1	11,3	2,2
7.	13,3	15,1	1,8	10,1	10,5	0,4
8.	14,8	17,6	2,8	12,0	12,6	0,6
9.	12,8	15,2	2,4	11,8	12,1	0,3
10.	13,8	16,4	2,6	10,7	10,9	0,2
11.	10,0	12,4	1,5	12,6	13,3	0,7
12.	9,5	10,7	1,2	13,0	14,1	1,1
				11,5	12,1	0,6
				13,0	14,4	1,4
		Mittelw.	2,2		Mittelw.	0,74

Ganz anders geartet sind die Vorgänge im zerkleinerten Muskel (Muskelbrei) bei Gegenwart von Sauerstoff. Hahn, Fischbach, und Niemer unternahmen 1930 Versuche mit Muskelbrei und konnten zeigen, daß bei Anwesenheit von Sauerstoff keine Verminderung der Milchsäure bei gleichzeitg annähernder Konstanz der Kohlehydrate auftrat (4). Es konnte also im zerkleinerten Muskel keine Resynthese von Glykogen, wie sie im intakten Muskel als Erholungsvorgang beobachtet wurde, nachgewiesen werden.

Lipmann berichtete 1933 von Untersuchungen über die oxydative Hemmbarkeit der Milchsäurebildung im Muskel (5). Er wollte, wie er selbst sagt, die oxydative Beeinflußbarkeit des glykolytischen Fermentes untersuchen, das, ein Ferment oder Fermentkomplex, für die Glykolyse verantwortlich gemacht wird. Dazu benützte Lipmann Oxydationsmittel von bekannter Intensität und

kam zu dem Schluß, daß die Hemmung der Glykolyse auf einer Inaktivierung des glykolytischen Fermentes durch Sauerstoff beruht. Diese Inaktivierung gehe mit der Oxydation des Fermentes einher und sei reversibel. Das oxydierte Ferment sei unwirksam.

Obwohl die Pasteur'sche Reaktion im Muskel ein häufig untersuchter Vorgang ist, konnte sie bisher noch nicht einwandfrei geklärt werden, da die Anschauung Lipmanns nicht bewiesen ist.

Es sei hier noch hervorgehoben, daß Pasteur als erster eine Hemmung der Gärung (Glykolyse) durch Sauerstoff bei Hefezellen beobachtet hat. Es wird nun im folgenden von „Pasteur'scher Reaktion" nur in Beziehung auf diese Hemmung durch Sauerstoff gesprochen, obwohl die Vorgänge, die sich im Muskel abspielen, mit denen der Hefezellen nicht gleichzusetzen sind.

Eigene Versuche.

Es war zu eruieren, ob der für die Pasteur'sche Reaktion im Muskel verantwortliche Stoff aus dem Muskel extrahiert werden kann und ob er ein Ferment ist.

1.) Hemmung der Glykolyse im Muskel durch Sauerstoff (Pasteur'sche Reaktion).

Versuchsanordnung. (Gültig für alle vorgenommenen Versuche.)

Es wurde ganz frisch vom Schlachthof bezogener Muskel eines Jungstieres verwendet, der mittels einer Fleischmaschine zerkleinert wurde, die statt der gewöhnlich beigegebenen Scheibe eine andere mit Löchern von 1½ mm Durchmesser zur besseren Zerkleinerung besaß. Die Versuche wurden in Gefäßen angestellt, die die Form großer Reagensgläser hatten (285/35) und durch Gummistopfen gut verschließbar waren, sodaß sie unter dem Wasser eines Thermostaten dicht schlossen. Die Gummistopfen trugen in ihrer Bohrung ein mit Druckschlauch und Klemme verschließbares Glasrohr. Die Ansätze waren zusammengesetzt aus 5 g Muskelbrei und 25 ccm Phosphatpuffer. Dieser bestand aus 2 Volumteilen Puffer (3,6 g Kaliumphosphat + 7,2 g Natriumphosphat in 1 Ltr. Wasser) und 1 Volumteil Wasser. Es wurden 3 solche Ansätze angesetzt. Einer diente zur Bestimmung der bei Versuchsbeginn vorhandenen Milchsäure, der andere zur Milchsäurebestimmung

nach Digestion im Vakuum, ein dritter zur Bestimmung der Milchsäure nach Digestion mit Sauerstoff. Die beiden letzten Versuche wurden an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, bis das Manometer einige Zeit lang eine konstante Einstellung aufwies und dann durch Zudrehen mit Schraubenklemmen verschlossen. Von den beiden evakuierten Gefäßen wurde hierauf eines mit Sauerstoff an einem Gasometer gefüllt und dabei kräftig geschüttelt, damit sich die Flüssigkeit mit Sauerstoff sättigte. Die beiden Reagensgläser, das evakuierte wie das mit Sauerstoff gefüllte, wurden zur gleichen Zeit unter das Wasser eines Thermostaten von 37° gebracht und mit einer mechanischen Vorrichtung verbunden, die gestattete, den Inhalt der Röhren unter Wasser dauernd zu schütteln. So wurde 2—3 Stunden digeriert. Gleich nach dem Einsetzen der beiden Reagensgläser in den Thermostaten wurde der erste der drei Versuche, der zur Milchsäurebestimmung am Anfang des Versuches diente, unterbrochen, indem man ihn mit 20 ccm einer 4% igen Salzsäurelösung und 40 ccm gesättigter Sublimatlösung enteiweißte Nach kräftigem Umschütteln wurde er in einen Erlenmeyerkolben umgeleert und mit etwas Wasser nachgespült, um quantitative Verluste zu vermeiden. Der Erlenmeyerkolben wurde öfters zum Zwecke der vollkommenen Enteiweißung umgeschüttelt. Über Nacht wurde er dann im Eisschrank stehen gelassen. Am nächsten Morgen war die Enteiweißung beendet. Nach 2—3 stündiger Digestion wurden die beiden anderen Versuche unterbrochen und in gleicher Weise behandelt.

Am nächsten Tag wurde der Inhalt jedes der 3 Erlenmeyerkolben in einen 200 ccm-Meßkolben gegossen, mit Wasser nachgespült und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, hierauf durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Vom klaren Filtrat wurden 150 ccm zur weiteren Bestimmung verwendet. Mit 20 ccm einer 10% igen Kupfersulfatlösung und 40 ccm Kalkmilch (200 g Calciumoxyd in 1 Ltr. Wasser) wurden die gelösten Kohlehydrate ausgefüllt. Zu diesem Zwecke wurden die 150 ccm Filtrat in einen 300 ccm-Meßkolben gespült und mit 30% iger Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert, dann die Kupfer-Kalk-Fällung vorgenommen und gut umgeschüttelt. Der Inhalt des Meßkolbens wurde hierauf in einen Erlenmeyerkolben gebracht und unter oftmaligem Umschütteln 30 Minuten lang stehen gelassen, schließlich durch ein trokkenes Faltenfilter filtriert. Vom Filtrat verwendete man 100 ccm zur Bestimmung der Milchsäure, die nach dem von Friedemann, Cotonio und Shaffer ausgearbeiteten Verfahren (6) vorgenommen wurde. Vor Einfüllen in den Kochkolben des Milchsäurebestimmungsapparates wurde die Flüssigkeit mit 10% Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Rotfärbung durch Phenolphthalein neutralisiert. Die Milchsäuremengenberechnung war folgende:

45 mg Milchsäure verbrauchen 100 ccm n/100 Jodlösung. Die erhaltene Milchsäuremenge mußte mit der Zahl 4 multipliziert werden, um die Milchsäuremenge in 5 g Muskelbrei festzustellen.

Tabelle 1. (mg Milchsäure)

	Direkt	28,4	21,4	23,6	22,4	23,0	11,5	18,4
Digeriert	Im Vakuum	49,2	57,5	52,5	40,2	29,0	36,8	51,7
	Mit Sauerstoff	24,2	18,0	27,8	21,2	23,6	10,3	26,9

Aus der Tabelle 1 ist klar ersichtlich, daß in allen Versuchen eine ausgeprägte Pasteur'sche Reaktion auftrat, das heißt: im Vakuum starke Glykolyse, die in den Ansätzen mit Sauerstoff völlig oder fast ausfällt, sodaß die Milchsäurewerte gegenüber denen bei Versuchsbeginn (in der Tabelle mit „Direkt" bezeichnet) keine oder nur geringe Zunahme aufweisen.

2.) Versuche mit Muskel, Waschsaft u. Muskel u. Waschsaft.

Der Muskelbrei wurde mit der doppelten Gewichtsmenge Phosphatpuffer (pH = 7,0) 3/4 Stunden auf einer Schüttelmaschine geschüttelt und hierdurch ausgewaschen, die Waschflüssigkeit (in der Tabelle mit Waschsaft bezeichnet) auf einem gewöhnlichen Faltenfilter abfiltriert und der Muskelrückstand auf einer Fruchtpresse scharf abgepreßt. (Der Muskelrückstand ist in der Tabelle als Muskel gekennzeichnet). Muskelrückstand, Waschflüssigkeit und Muskelrückstand mit Waschflüssigkeit zusammen wurden mit Sauerstoff und im Vakuum 3 Stunden lang bei 37° digeriert, die erhaltenen Milchsäurewerte sodann mit denen bei Versuchsbeginn (in der Tabelle unter „Direkt" aufgeführt) verglichen.
Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1. Versuche mit Muskelrückstand allein.
   5 g Muskelrückstand
   25 ccm Phosphatpuffer (pH = 7).
2. Versuche mit Waschflüssigkeit allein.
   25 ccm Waschflüssigkeit.
3. Versuche mit Muskelrückstand und Waschflüssigkeit.
   5 g Muskelrückstand
   25 ccm Waschflüssigkeit.

Tabelle 2. (mg Milchsäure)

Muskel			Waschsaft			Muskel und Waschsaft		
direkt	digeriert		direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
11,0	15,0	17,6	19,1	30,0	30,0	31,0	50,0	37,9
10,0	25,5	25,5	21,0	43,4	42,2	25,9	85,0	46,0
8,4	14,4	13,2	26,5	47,6	44,5	33,6	61,2	31,2
8,6	25,7	25,4	26,8	55,4	55,4	33,3	84,2	43,7
7,9	19,2	19,2	26,4	56,2	55,2	33,6	76,7	39,6
7,2	18,7	18,5	20,8	50,2	48,0	31,2	73,2	33,6
—	—	—	—	—	—	28,8	85,0	35,6

Aus Tabelle 2 ersieht man, daß bei den Versuchen mit Muskelrückstand allein eine Milchsäurevermehrung sowohl mit Sauerstoff als auch im Vakuum eintritt. Eine Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff findet also nicht statt. Dasselbe gilt für alle Versuche mit Waschflüssigkeit allein, bei denen ebenfalls nie eine Pasteur'sche Reaktion auftrat. Nur in den Versuchen mit Muskelrückstand und Waschflüssigkeit zusammen wurde eine starke Hemmung zuweilen sogar Aufhebung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff beobachtet. Daraus ist zu schließen, daß in der Waschflüssigkeit ein Stoff vorhanden ist, der für das Auftreten der Pasteur'schen Reaktion notwendig ist und beim Auswaschen des Muskels mit Phosphatpuffer aus diesem entfernt wird. Da in der Waschflüssigkeit allein keine Pasteur'sche Reaktion zustande kam, ergibt sich, daß zu diesem Phänomen auch der Muskel selbst notwendig ist.

3.) Versuche mit gekochter u. ungekochter Phosphatwaschflüssigkeit.

Bei diesen Versuchen wurde Phosphatwaschflüssigkeit verwendet, die drei Minuten gekocht worden war. Das dabei ausgefällte Eiweiß wurde abfiltriert und das Filtrat zum Muskelrückstand zugesetzt. Gleichzeitig wurden Versuche mit ungekochter Phosphatwaschflüssigkeit und Muskelrückstand angestellt, deren Ergebnisse mit denen der Versuche mit gekochter Phosphatwaschflüssigkeit verglichen wurden. Nachfolgende Tabelle zeigt die Milchsäurewerte in Gegenüberstellung.

Tabelle 3. (mg Milchsäure)

	direkt	digeriert	
		im Vakuum	mit Sauerstoff
Ungekocht	29,2	70,5	34,5
Gekocht	28,8	50,6	46,7
Ungekocht	28,3	65,8	34,0
Gekocht	34,0	54,0	52,0

Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, daß die Phosphatwaschflüssigkeit ihre Wirkung verliert, wenn sie gekocht wird, während die ungekochte Waschflüssigkeit der Versuche der Tabelle 3 eine deutliche Hemmung der Milchsäurebildung mit Sauerstoff hervorruft. Der für die Pasteur'sche Reaktion verantwortliche Stoff wurde beim Kochen der Phosphatwaschflüssigkeit entweder zerstört oder wurde mit dem Eiweiß ausgefällt. Eine genaue Erklärung kann erst später gegeben werden.

4. Versuche mit Lösung A.

Es wurde daran gegangen, den für die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff notwendigen Stoff zu isolieren. Dies wurde zunächst dadurch erreicht, daß es gelang, die größte Menge des Eiweißes in der Phosphatwaschflüssigkeit durch Fällung mit Aceton von ihm zu trennen.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Durch eine Kältemischung wurde die Phosphatwaschflüssigkeit auf 0^0 C abgekühlt, hierauf langsam Aceton von etwa 0^0 C Temperatur zugegeben und darauf geachtet, daß das Thermometer nie über $2 — 3^0$ C anzeigte, da sonst die Acetonfällung zu unwirksamen Säften führt. So wurde zur Phosphatwaschflüssigkeit allmählich das gleiche Volumen Aceton zugesetzt, über Nacht im Eisschrank bei 0^0 C stehen gelassen und am nächsten Tag der dicke, hauptsächlich aus Eiweiß bestehende Niederschlag durch ein Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde dann im Vakuum bei $35 — 38^0$ C eingedampft, bis das Aceton vertrieben war und die Flüssigkeit etwa 2/3 des Volumens der ursprünglichen Phosphatwaschflüssigkeit hatte. Diese Flüssigkeit erhielt die Bezeichnung „Lösung A". Mit dieser Lösung wurden

Versuche von derselben Zusammensetzung wie die der Versuche mit Phosphatwaschflüssigkeit angestellt. Die Ansätze mit Muskelbrei, der mit Phosphatpuffer ausgewaschen und dann mittels Fruchtpresse ausgepreßt worden war, hatten folgende Zusammensetzung:

5 g Muskelrückstand
25 ccm Lösung A.
5 ccm Phosphatpuffer (pH = 7,0).

Es wurden damit Versuche mit Lösung A allein und mit Muskelrückstand allein (in der Tabelle „Muskel" bezeichnet) verglichen von der früher angegebenen Zusammensetzung.

Tabelle 4. (mg Milchsäure)

Muskel			Lösung A			Muskel u. Lösung A			H: Zusatz von Hexosediphosphorsäure
	digeriert			digeriert			digeriert		
direkt	im Vakuum	mit Sauerstoff	direkt	im Vakuum	mit Sauerstoff	direkt	im Vakuum	mit Sauerstoff	
4,8	17,5	14,8	32,0	34,6	33,0	38,5	63,8	37,4	
7,2	44,3	40,5	52,5	56,6	57,0	62,3	96.5	73.0	H
8,1	24,8	21,7	28,8	29,0	29,0	36,4	71,1	39,4	H
7,4	30,9	27,0	44,6	43,8	42,5	46,7	78,6	47,7	H
6,6	29,9	28,8	20,2	23,4	22,8	27,6	59,5	36,2	H

Tabelle 4 enthält die Resultate. Bei den Versuchen, die mit H bezeichnet sind, wurden 100 mg hexosediphosphorsaures Natrium zugesetzt, da durch die Acetonfällung ein Teil der in der Phosphatwaschflüssigkeit vorhandenen Milchsäurequellen mit ausgefällt wurde. Man sieht, daß Muskelrückstand allein und Lösung A allein keine Pasteur'sche Reaktion ergeben. Nur wo Lösung A mit Muskelrückstand zusammen wirkt, ist die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff zu beobachten.

In der folgenden Tabelle 5 sind noch weitere Versuche mit Lösung A und Muskelrückstand gegeben ohne die Kontrollen der Tabelle 4. Auch hier kann völlig regelmäßig die Pasteur'sche Reaktion in Muskel, der mit Phosphatpuffer ausgewaschen und ausgepreßt wurde und dem Lösung A zugesetzt wurde, beobachtet werden.

Tabelle 5. (mg Milchsäure)

	Direkt	53,4	53,4	52,6	23,4	33,6	28,1
Digeriert	Im Vakuum	62,5	78,4	103,0	45,0	55,6	47,9
	Mit Sauerstoff	43,6	56,2	72,0	31,8	34,2	31,7

5. **Versuche mit gekochter und ungekochter Lösung A.** Lösung A wurde, wie die Phosphatwaschflüssigkeit der Versuchsreihe 3, drei Minuten lang gekocht, sodann mit ihr und mit ungekochter Lösung A Versuche angestellt. In einem Falle wurde hierbei die Phosphatwaschflüssigkeit, aus der Lösung A hergestellt wurde, mit untersucht. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 6. (mg Milchsäure)

	Lösung A			Waschsaft		
	direkt	digeriert		direkt	digeriert	
		im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
Gekocht . .	31,3	51,5	30.6	—	—	—
Ungekocht .	38,7	58,8	39,6	—	—	—
Gekocht . .	34,9	51,5	35,1	28,8	50,6	46,7
Ungekocht .	43,2	58,0	35,4	29,2	70,5	34,5

Im Gegensatz zur Phosphatwaschflüssigkeit (in der Tabelle Waschsaft bezeichnet) verliert die Lösung A ihre Wirksamkeit durch Kochen nicht. Dies ist so zu erklären, daß der Stoff, dessen Gegenwart die Pasteur'sche Reaktion auslöst, kochbeständig, somit kein Ferment ist. Beim Kochen der Phosphatwaschflüssigkeit wurde das Eiweiß koaguliert, der Stoff an das Koagulum adsorbiert und auf diese Weise unwirksam gemacht.

Zusammenfassung.

1. Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff im Muskel durch einen Stoff bedingt ist, der durch Auswaschen mit Phosphatpuffer aus der Muskulatur entfernt werden kann.
2. Es ist gelungen, diesen Stoff durch Acetonfällung fast völlig von der Eiweißfraktion zu trennen.
3. Der Stoff, der die Pasteur'sche Reaktion im Muskel auslöst, ist kochbeständig, also kein Ferment.

Am Ende meiner Arbeit sei mir erlaubt, Herrn Professor Dr. Dr. A. Hahn für die gütige Überlassung des Themas und die mir erteilten Ratschläge meinen Dank zu sagen. Herrn Dr. H. Niemer bin ich für seine Anleitung zu den Versuchen und deren Förderung sehr dankbar.

Literatur.

1. Embden und Mitarbeiter: B. Z. 45, 1912, 45 und 63
2. Meyerhof: Die chemischen Vorgänge im Muskelstoffwechsel.
3. Hahn, Belmonte und Niemer: Z. für Bio. 1931, Band 91/Heft
4. Hahn, Fischbach und Niemer: Z. für Bio. 1930, Band 91/Heft 1.
5. Lipmann: Biochemische Z. 1933, 268 Seite 133.
6. Friedemann, Cotonio und Shaffer: Inl. Biol. chem. 73, 1927, 334 und 359.

Lebenslauf.

Als Sohn des damaligen Postassistenten Johann Franz Diem und seiner Ehefrau Helene geb. Reichhart wurde ich am 17. Juni 1909 in Landshut an der Isar geboren. Ende September 1914 übersiedelten meine Eltern nach München, wo ich 1915 bis 1920 die Volksschule, anschließend 9 Jahre das Realgymnasium besuchte. 1929 inscribierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München und studierte hier 12 Semester lang Medizin. Im Sommer 1935 legte ich das medizinische Staatsexamen ab. Als Medizinalpraktikant war ich am Pathologischen Institut der Universität München, anschließend im chemischen Laboratorium des Physiologischen Instituts tätig, wo ich meine Doktorarbeit vollendete. Seither arbeite ich an der medizinischen Abteilung des städtischen Krankenhauses München rechts der Isar. Am 1. August 1936 wurde mir die Bestallung als Arzt erteilt.

BUCH- UND KUNSTDRUCKEREI G. EBERMAYER
MÜNCHEN – INHABER M. SCHNEEBERGER